

缺血性视神经病变视网膜神经节细胞凋亡过程中蛋白激酶 C 的改变

郭瑶¹, 陈蕾², 柳力敏², 王敏芳¹

基金项目: 中国辽宁省沈阳市科技基金资助项目(No. 1063237-3-00)
作者单位:¹(110031) 中国辽宁省沈阳市第四人民医院眼科;²(110001) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院眼底病中心

作者简介: 郭瑶, 女, 副主任医师, 博士研究生, 导师陈蕾, 研究方向: 眼底疾病。

通讯作者: 郭瑶. gy9818@163. com

收稿日期: 2009-03-30 修回日期: 2009-06-08

Change of protein kinase C during the apoptosis of retinal ganglial cells of ischemic optic neuropathy

Yao Guo¹, Lei Chen², Li-Min Liu², Min-Fang Wang¹

Foundation item: Science and Technology Foundation of Shenyang City, Liaoning Province, China(No. 1063237-3-00)

¹Department of Ophthalmology, the Fourth People's Hospital of Shenyang City, Shenyang 110031, Liaoning Province, China; ²Ocular Fundus Disease Center, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yao Guo. Department of Ophthalmology, the Fourth People's Hospital of Shenyang City, Shenyang 110031, Liaoning Province, China. gy9818@163. com

Received: 2009-03-30 Accepted: 2009-06-08

Abstract

• AIM: Optic nerve injury is often characterized by the axon damage of retinal ganglial cells (RGC), so it is meaningful for us to prevent optic ganglion from damage by studying the ischemic optic neuropathy (ION) models to conquer the blinding ophthalmocace. Accumulating studies show that Ca²⁺ channel blocker plays a vital role in optic nerve protection.

• METHODS: Ninety Wister rats were divided into 3 groups including the control, the ION and the ION Ver blocking. The ION group and the Ver blocking group include four subgroups according to time sequence, 1 day, 3days, 5days and 7days, respectively. Western blot method was used to determine the expression of PKC of all groups and immunohistochemical method was used to determine the RGC apoptosis of all groups.

• RESULTS: Small amount of PKC was detected in the control through Western blot and the amount of PKC increases during the apoptosis than that in the control ($P < 0.05$). After treated with Ver, the expression of PKC weakened but still higher than that in the control ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: During the process of apoptosis of ION

RGCs, PKC is involved the apoptosis signaling and related to the Ca²⁺ concentration.

• KEYWORDS: ischemic optic neuropathy; protein kinase C; blocker; rat

Guo Y, Chen L, Liu LM, et al. Change of protein kinase C during the apoptosis of retinal ganglial cells of Ischemic Optic Neuropathy. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(6):1061-1062

摘要

目的: 研究缺血性视神经病变模型, 钙通道阻滞剂的保护研究中具有重要意义。

方法: Wister 大鼠 90 只, 分为正常组、缺血性视神经病变组及缺血性视神经病变 Ver 阻断组。缺血性视神经病变组及 Ver 阻断组分为 1, 3, 5, 7d 组。用 Western blot 技术检测视网膜神经节细胞内 PKC 表达。用免疫组化方法观察视网膜神经节细胞凋亡。

结果: 视网膜对照组神经节细胞可见少量 PKC 表达, 细胞凋亡后, PKC 蛋白表达增强, 与对照组差异有显著性 ($P < 0.05$)。加 Ver 后 PKC 蛋白表达减弱, 但仍比对照组增强, 差异有显著意义 ($P < 0.05$)。

结论: 缺血性视神经病变视网膜神经节细胞凋亡过程中, 有 PKC 参与, 并与细胞内钙的浓度相关。

关键词: 缺血性视神经病变; 蛋白激酶 C; Ver 阻断剂; 大鼠
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2009.06.014

郭瑶, 陈蕾, 柳力敏, 等. 缺血性视神经病变视网膜神经节细胞凋亡过程中蛋白激酶 C 的改变. 国际眼科杂志 2009;9(6):1061-1062

0 引言

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC), 是一个由多种同功酶组成的蛋白质家族, 参与生物活性物质的分泌、膜通道的调节、细胞蛋白质及 DNA 合成等多种细胞生物学效应, 是细胞信号转导途径中的主要成分之一。PKC 广泛分布于所有的动物组织细胞中, PKC 是一种重要的丝氨酸苏氨酸 (Ser/Thr) 激酶, 1977 年被 Nishizuka 等首先发现, 它是依赖 Ca²⁺/磷脂 (PL) 的蛋白激酶, 是 PI 信号转导系统中的一个中心环节。随着国内外研究的不断深入, 人们已经对糖尿病慢性血管并发症的发生机制有了越来越多的认识。最近大量研究表明, 信号分子甘油二酯 (diacylglycerol, DAG) 的含量增加和 PKC 的激活与糖尿病的视网膜、肾脏、心血管组织病变等有密切联系, 在糖尿病血管并发症的发生发展中 PKC 具有重要的调控作用^[1]。PKC 作用与细胞增殖粘附及通透性、细胞外基质形成等有密切关系, 这些糖尿病血管病变涉及到的病理机制, 综述如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选用体质量为200~250g Wister大鼠90只,分为正常组、缺血性视神经病变组及缺血性视神经病变Ver阻断组。缺血性视神经病变组及Ver阻断组分为1,3,5,7d组。实验前散瞳查眼底,无血管走行异常,血晕良好,无视神经萎缩。鱼精蛋白:美国Sigma公司;[γ -³²P]ATP:北京亚辉生物有限公司;新生牛血清:杭州四季青生物工程材料研究所;胰蛋白酶(1:250Difco, Gibco),匀浆机:瑞士Kinematica GmbH;紫外分光光度仪DV-60,液闪计数仪:德国BeckmanLS3801;凝胶电泳分析仪(Fluorche):美国Alpha公司;垂直电泳装置,水平摇床,SDS缓冲液,新生牛血清:杭州四季青生物工程材料研究所,胰蛋白酶(1:250Difco, Gibco),SDS。

1.2 方法 缺血性视神经病变模型制作^[1]:收集正常RPE细胞及Ver作用12,24,48h组的RPE细胞,将对照组及Ver作用的RPE细胞的培养液弃之,PBS洗2次,细胞刮刀刮取培养瓶的细胞,每组收集 10^6 细胞,PBS洗液,吸入1.5mL的Eppendorf管中,4℃10000r/min,离心8min。弃上清,然后加入200 μ L细胞裂解液,4℃冰箱过夜,然后4℃超声波粉碎1min吸出上清液,4℃10000r/min,离心8min。上清液即为组织细胞裂解液。每组取上清10 μ L测蛋白浓度(brandford法),调整各标本蛋白浓度一致。调整蛋白浓度后的组织细胞蛋白裂解液加入等体积1 \times 电泳加样缓冲液,混匀后置95~100℃水中加热3min,使蛋白变性,即为电泳标本。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳。SDS终浓度20g/L,每孔加样20 μ g,分离胶电压120V,浓缩胶电压100V,电泳直至染料达到分离胶底部。电泳结束后揭胶,浸入转印缓冲液平衡15min,剪取硝酸纤维素膜(PVDF)在甲醇中浸泡10min,转印缓冲液浸泡15min,转膜次序从负极依次是:垫片-滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸-垫片-阳极。然后以电压90V,电流200mA,低温转膜2h。转膜结束后,将PVDF膜置于TBST缓冲液中漂洗,加封闭液,水平摇床振荡2h,TBST液洗膜3 \times 15min/次,分别加入。4℃孵育过夜。TBST洗膜3 \times 15min/次,然后将膜置于辣根过氧化物酶标记贻养抗兔的二抗(1:400)中,室温孵育2h,TBST液洗膜3 \times 15min/次,碱性磷酸酶显色液(AP)呈色5min,淋干膜,扫描照片。自动电泳凝胶成像分析系统下成像对目的条带进行灰度扫描分析,FluorChenV.2.0系统采集扩增条带的整合光密度值,读取相对积分吸光度(A)。

统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析统计学检验, $P < 0.05$ 有统计学差异。统计过程均用SPSS 11.5软件进行。

2 结果

对照组视网膜神经节细胞可见少量的PKC表达,细胞凋亡后,可见PKC蛋白表达增强,与对照组差异有显著性($P < 0.05$)。加Ver后PKC蛋白表达减弱,但仍比对照组增强,差异有显著意义($P < 0.05$,图1)。

3 讨论

PKC是一种重要的第二信使,通过将胞外信息传递到

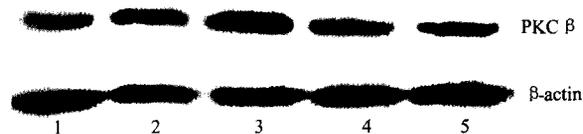


图1 PCK蛋白表达

细胞内,它调节着细胞的生长发育、收缩、分泌、传导、通透性、细胞外基质和基因表达等。由胞内第二信使激活的蛋白激酶系统有:APK系统(cAMP-PK),GPK系统(cGMP-PK),PKC系统(磷脂/Ca-PK),Ca/CaM依赖的蛋白激酶系统。它们之间的相互作用代表着各种信使物质之间的相互调节。目前认为,PKC系统在各信使系统相互作用的蛋白磷酸化过程中占有中心地位。到目前为止,在哺乳动物组织内已确定10种PKC亚类(8-3),PKC的所有亚类都由一条单肽链组成,分子量大约为67~83kDa,PKC广泛分布于多种组织、器官和细胞,静止细胞中PKC主要存在于胞质中,当细胞受到刺激后,PKC以Ca²⁺依赖的形式从胞质中移位到细胞膜上,此过程称之为转位(translocation)。一般将PKC的转位作为PKC激活的标志。PKC的活性依赖于钙离子和磷脂的存在,但只有在磷脂代谢中间产物二酰基甘油(DAG)存在下,生理浓度的Ca²⁺才起作用,这是由于DAG能增加PKC对底物亲和力的缘故。

PKC分布于亚细胞室内,当受到相应的激动剂激活时,转位到膜上,与膜磷脂或受体结合。有些PKC亚型也可在可溶性状态下激活。PKC可磷酸化蛋白质底物的丝氨酸和苏氨酸残基,调节蛋白质的功能。通过调节受体的再循环和外突率可调节受体的数量,也可通过磷酸化离子通道的内侧来影响Ca²⁺通道的活动。除DAG-PKC传导通路外,有报道缺血性视神经病变也影响了其它信号传导通路,如与Ca²⁺相关的机制、磷酸肌醇系统、鸟苷酸环化酶(cGMP)、G蛋白及离子运输机制等。其中除了与Ca²⁺相关的机制研究较多外,其它通路目前研究不多。另一方面,现已发现的细胞内各个信号传导系统之间的相互作用十分复杂,不完全清楚。因此,DAG-PKC传导通路与缺血性视神经病变合并症之间的关系研究,有望给缺血性视神经病变合并症的防治带来新的希望。

参考文献

- 1 Moriarty P, Dickson AJ, Eeichsen JT, et al. Protein kinase C isoenzyme expression in retinal cells. *Ophthalmic Res* 2000;32:57-60
- 2 Martins LM, Eamshaw WC. Apoptosis alive and kicking. *Trends Cell Biol* 1997;7(3):111
- 3 Soulis T, Thallas V, Youssef S, et al. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* 1997;40(6):619-628
- 4 Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;47(6):859-866
- 5 Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* 1998;10(8):529-542
- 6 Haller H, Baur E, Quass P, et al. High glucose concentrations and protein kinase C isoforms in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 1995;47(4):1057-1067